

Aus der Blutbank (Leiter: Prof. Dr. I. Hoppe)  
der Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg

---

Transferversuche mit immunologisch  
determinierten Stammzellen zur Analyse  
des Phänomens der Empfänger-  
konditionierung

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
SAN GIE OEY  
4742 Stromberg/Westf.  
Oelder Tor 14

'976



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der Blutbank (Leiter: Prof. Dr. I. Hoppe)  
der Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg

---

# Transferversuche mit immunologisch determinierten Stammzellen zur Analyse des Phänomens der Empfänger- konditionierung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

SAN GIE OEY

4742 Stromberg/Westf.

Oelder Tor 14

Referent:

Professor Dr. I. H o p p e

Korreferent:

Professor Dr. T. Diamantstein



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. 7. 76

Herrn Prof. Dr. med. Immo H o p p e  
danke ich sehr herzlich für die  
Überlassung des Themas der vorlie-  
genden Arbeit und für seine stete  
Hilfsbereitschaft bei der Vollen-  
dung.

Frau E. J a h n danke ich beson-  
ders herzlich für ihre exzellente  
Einführung in die Methodik.



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                         | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. <u>EINLEITUNG</u>                                                    | 1     |
| 1.1 Stammzelldefinition                                                 | 1     |
| 1.2 Indikationen und Probleme der Stammzelltransplantation              | 2     |
| 1.3 Empfängerkonditionierung bei Stammzelltransplantation               | 4     |
| 2. <u>PROBLEMSTELLUNG</u>                                               | 5     |
| 3. <u>MATERIAL und METHODE</u>                                          | 6     |
| 3.1 Antigen und Versuchstiere                                           | 6     |
| 3.2 In vivo-Kultur-Methode                                              | 7     |
| 3.3 Intravenöser Transfer                                               | 10    |
| 3.3.1 Zellzubereitung und -transfer                                     | 10    |
| 3.3.2 Serumgewinnung und -titration                                     | 11    |
| 3.3.3 Statistische Aufarbeitung                                         | 12    |
| 3.4 Transfer in Diffusionskammern                                       | 12    |
| 3.5 Empfängervorbehandlung                                              | 15    |
| 4. <u>VERSUCHSTEILE und ERGEBNISSE</u>                                  | 17    |
| 4.1 Prüfung des Effektes einer Empfängervorbehandlung                   | 17    |
| 4.2 Dosis-Wirkung-Beziehung der radiologischen Empfängerkonditionierung | 18    |
| 4.3 Empfängerkonditionierung durch Strahlen und Zytostatika             | 19    |
| 4.4 Ausschluß einer Allotransplantatreaktion                            | 21    |
| 4.5 Grundlage der Empfängerkonditionierung                              | 22    |
| 4.6 Erforderliche Einwirkdauer des Konditionierungsfaktors              | 24    |
| 4.7 Kinetik des Konditionierungsfaktors                                 | 26    |
| 4.8 Zeitabhängigkeit des Konditionierungseffektes auf Zellebene         | 28    |

|                                             | Seite |
|---------------------------------------------|-------|
| 5. <u>DISKUSSION</u>                        | 31    |
| 6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>                   | 40    |
| 7. <u>ANHANG - TABELLEN und ABBILDUNGEN</u> | 42    |
| 8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>              | 52    |

## 1. E I N L E I T U N G

### 1.1 Stammzelldefinition

Unter einer "Stammzelle" versteht man den zellulären Ausgangspunkt von hämopoetischen bzw. immunopoetischen Zelllinien. Eine Stammzelle besitzt 1.) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie 2.) die Fähigkeit, auf entsprechende Reize hin Zellerneuerungssysteme im quantitativen Gleichgewicht zu halten (21, 25).

Gemeinsamer Ausgangspunkt der hämopoetischen und immunologischen Zellreihen ist die "colony forming unit" (CFU) (28). Ihr nachgeordnet sind sog. nicht-determinierte Stammzellen, die schon dem einen oder anderen Zellerneuerungssystem nahestehen, jedoch entwicklungsmäßig unter dem Einfluß humoraler Faktoren bzw. Antigene noch zugunsten anderer Systeme mobilisiert werden können. Es folgen Zelltypen, die von der eingangs gegebenen Stammzelldefinition insofern abweichen, als sie nicht präexistent sind. Vielmehr verdanken sie ihre Entstehung der vorerwähnten Stammzellgeneration bzw. deren Reaktion auf einen adäquaten Reiz. Diese Zellen sind hinsichtlich ihrer Entwicklungsmöglichkeit weitgehend festgelegt; unsicher ist ferner das Ausmaß, in dem sie noch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (12). Hierhin gehören die sog. immunologisch determinierten Stammzellen vom Typ der "memory cells" (Typ Y/PC<sub>2</sub>) (19, 25, 47). Die ihnen folgende Zellgeneration ist sicher unipotent. Sie ist zwar noch proliferationsfähig (19, 25, 47, 54), befindet sich aber in Ermangelung der Fähigkeit zur Selbsterneuerung auf dem Wege der sog. "suizidalen Differenzierung" (25).

Gemische von Stammzellen und stammzellähnlichen Zellen der verschiedenen Reifegrade sowie der unterschiedlichsten Differenzierungsrichtungen finden sich ubiquitär im tierischen Organismus. Gegenüber der Majorität reifer Zellformen stellen sie eine biologisch höchst bedeutsame, wenn auch zahlenmäßig verschwindend kleine Fraktion dar (12, 25). Für Transplantationszwecke können sie gewonnen werden aus hämopoetischen und lymphatischen Organen (Knochenmark, Lymphknoten, Milz, Thymus, fötale Leber), ferner aus dem Lymphozytenbestand des zirkulierenden Blutes (7, 12).

#### 1.2 Indikationen und Probleme der Stammzelltransplantation

Zellsuspensionen dieser Organe tragen also in sich die für Stammzellen typische mehr oder minder ausgeprägte Pluripotenz sowie Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Nach Übertragung vermögen sie auf Grund dessen im bedürftigen Empfänger hämopoetische bzw. immunopoetische Funktionssysteme wieder herzustellen. Dies gilt insbesondere für den Fall, daß empfangereigene Systeme ihre Tätigkeit aufgegeben haben bzw. bestimmte Zelllinien nach maligner Entartung und erfolgreicher onkologischer Therapie restituiert werden müssen. Indikation für eine Stammzelltransplantation sind also 1.) hämopoetische und immunopoetische Insuffizienzen; 2.) Substitution nach Radikaltherapie maligner Systemerkrankungen der Hämo- und Lymphopoese (1, 13, 42, 43, 44). Dies ist ein relativ breites klinisches Indikationsfeld. Die Zahl der bisher insgesamt und in letzter Zeit jährlich auf der Welt durchgeführten Stammzelltransplantationen ist demgegenüber auffallend niedrig (1), Hinweis genug auf die dem Eingriff

inhärenten Schwierigkeiten. Sie ergeben sich aus der Qualität der jeweils vorliegenden Grundkrankheit sowie aus den noch ungelösten Problemen der Spender-Empfänger-Anpassung.

Noch immer gelten Neoplasien der Hämoopoese und des lymphatischen Systems als inkurabel. Einerseits ist damit zu rechnen, daß auch bei hochdosierter Chemo- oder Strahlentherapie einige maligne Zellen als Wurzel eines zukünftigen Rezidivs ausgespart werden. Andererseits wird diskutiert, daß selbst nach erfolgreicher Onkotherapie ein virusähnliches Agens persistiert, das die Malignität auf gesunde Zellen des Patienten oder des Transplantats zu übertragen vermag. Schließlich ist nicht zu übersehen, daß eine Radikaltherapie zwar in der Lage ist, die Neoplasie auszurotten, ihre Seiteneffekte zugleich aber die Lebensfähigkeit auch des Patienten entscheidend beeinträchtigen.

Maligne Systemerkrankungen wie systematische Insuffizienz Zustände sind gleichermaßen von den Problemen der immunologischen Spender-Empfänger-Anpassung überschattet; denn sieht man von glücklich gelagerten Ausnahmen (homozygote Zwillinge) sowie speziellen Indikationen (Autotransplantation bei Radikaltherapie generalisierter solider Tumoren) ab, erfolgt die klinische Stammzelltransplantation ausnahmslos im allogenen System. Analog der Situation bei der Nierenallotransplantation kommt es auf Grund antigener Unverträglichkeiten zunächst zu einer Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion. Im Gegensatz zu dem immunologisch inaktiven Nierentransplantat sind transplantierte Stammzellen ferner selbst zu einer

immunologischen Reaktion in der Lage. Zur Möglichkeit einer Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion (host-versus-graft-Reaktion) tritt komplizierend das Risiko einer (zeitlich etwas verzögert auftretenden) Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host-Reaktion) (7, 13, 39, 42, 44).

- 1.3 Empfängerkonditionierung bei Stammzelltransplantation  
Qualität der Grundkrankheit und/oder immunbiologische Gegebenheiten sind vordergründig Anlaß dafür, daß jeder Empfänger vor Durchführung einer Stammzelltransplantation einer intensiven Chemo- oder Strahlentherapie unterworfen wird (Dosen von 40-60 mg/kg Cyclophosphamid an vier aufeinanderfolgenden Tagen; Ganzkörperbestrahlung bis 1000 r). Einmal hat diese Vorbehandlung bei malignen Systemerkrankungen wie Insuffizienzständen der Hämo- und Lymphopoese das Ziel einer Immunsuppression. Bei malignen Systemerkrankungen erfüllt sie zusätzlich, besser sollte es heißen: in gleichrangiger Bedeutung, eine kurative Aufgabe (11, 13, 39, 42).

Zu denken gibt aber die Tatsache, daß eine Empfänger-vorbehandlung bei Stammzelltransplantationen auch dann üblich ist, wenn eine neoplastische Grundkrankheit ausgeschlossen ist und darüber hinaus optimale Verhältnisse in Hinsicht auf die Spender-Empfänger-Anpassung bestehen (11, 13, 17, 43, 44).

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Es war die Absicht unserer Studie zu klären, ob es über diese beiden Gesichtspunkte hinaus Gründe gibt, die auch in derartigen Sonderfällen eine Empfängervorbehandlung rechtfertigen. Kurzgefaßt lautete also die Alternative:

Empfängervorbehandlung = antineoplastische  
Massivtherapie und/oder Immunsuppression

oder

Empfängervorbehandlung = antineoplastische  
Massivtherapie und/oder Immunsuppression  
und/oder zusätzlicher "konditionierender"  
Faktor

Um diesen konditionierenden Zusatzfaktor erfassen zu können, wurde ein Versuchsmodell gesucht, in dem die beiden anderen Faktoren nicht zur Geltung kommen. Als geeignet zeigte sich der Zelltransfer zwischen genetisch identischen Experimentaltieren (keine Immunsuppression erforderlich!), deren Hämo- und Lymphopoese zugleich frei von Normabweichungen war (keine antineoplastische Therapie erforderlich!).

### 3. M A T E R I A L   u n d   M E T H O D E

- 3.1 Antigen und Versuchstiere: Als A n t i g e n wurde konserviertes Hammelblut der Behring-Werke AG verwendet (3 Vol. Hammelblut auf 2 Vol. Stablisator). Die Gebrauchslösung wurde kurz vor dem Versuch hergestellt. Proben von 10 ml des konservierten Hammelblutes wurden in der Stockzentrifuge zunächst 5 Min. bei 2.500 U/min. abgeschleudert, der überstehende Stabilisator verworfen und das Erythrozytensediment zweimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung, jeweils ad 10 ml, gewaschen (2.500 U/min., 5 Min.). Das nach dem zweiten Waschgang verbleibende Sediment wurde sodann in ca. 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und nach Doppelbestimmung des Erythrozytengehaltes mit der Schilling-Kammer auf die fertige Gebrauchslösung eingestellt. Die Endkonzentration je ml betrug für die Zwecke der intraperitonealen Spendersensibilisierung  $2,5 \times 10^8$ , für den Transferversuch intravenös  $5,0 \times 10^8$ , bei Transfer in Diffusionskammern  $1,2 \times 10^7$  Schafererythrozyten. Schafererythrozytensuspension für Titrationszwecke s. Abschnitt Antikörpertitration S. 12.
- Die erforderliche Weiterverdünnung der Stammlösung errechnete sich nach folgendem Beispiel: Suspension von 1 ml Erythrozytensediment mit 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung = 51 ml Totalvolumen; Erythrozytengehalt im ml =  $52,5 \times 10^7$ ; Gesamtzahl der Erythrozyten in 51 ml Suspension =  $51 \times 52,5 \times 10^7 = 2678,5 \times 10^7$ ; gewünschte Konzentration =  $25 \times 10^7$ /ml; in der vorliegenden Suspension ist diese Menge Erythrozyten =  $2678,5 : 25 = 107$  mal vorhanden; um die gewünschte Konzentration von  $25 \times 10^7$  Erythrozyten/ml zu erhalten,

Verdünnung auf Totalvolumen von 107 ml; zuzufügende Menge 0,9%iger NaCl-Lösung =  $107 - 51 = 56$  ml.

Als Versuchstiere wurden Mäuse beiderlei Geschlechts benutzt, die Inzuchtstämmen eigener Zucht und Haltung entstammten. Die Tiere wurden unter konstanten Verhältnissen gehalten (ca. 60 - 65 % Luftfeuchtigkeit,  $22^{\circ}\text{C}$  Raumtemperatur, Ozonbeimengung zur Atemluft 0,1 ml/cbm Raumluft, freier Zugang zu Wasser und Altromin<sup>(R)</sup>-Mischfutter).

Als Spendertiere benutzten wir etwa 12 Wochen alte Mäuse vom Typ C31 F<sub>1</sub> (C3 H/Anf Cum x 101/Cum), die 4 Wochen zuvor durch eine intraperitoneale Gabe von  $2,5 \times 10^8$  Schafererythrozyten in 1 ml primärexponiert worden waren. Vorversuche hatten gezeigt, daß dies eine optimale Sensibilisierungsdosis ist und das gewählte Zeitintervall zwischen Primär- und Sekundärexposition (Versuchsbeginn) eine optimale Sekundärreaktion garantiert.

Als Empfänger dienten Mäuse von 8 - 12 Wochen, die vorwiegend dem Typ 1C3 F<sub>1</sub> (101/Cum x C3 H/Anf Cum) angehörten. Unveröffentlichten Vorversuchen zufolge waren C31 F<sub>1</sub> - und 1C3 F<sub>1</sub> -Mäuse gleichermaßen für die in vivo-Kultur von zweitexponierten Milzzellen geeignet.

- 3.2 In vivo-Kultur-Methode (Abb. 1): Testzellen werden in genetisch identische Wirtstiere verbracht und haben hier Gelegenheit, sich fortzuentwickeln und selbst oder über ihre Nachkommenschaft spezifische Leistungen zu entfalten. Die Übertragung der Zellen kann erfolgen auf intravenösem Wege, wobei die übertragenen Zellen sich im Wirtsorganismus allgemein ansiedeln. Sie können in diesem Falle ausschließlich an ihren spezifischen

Leistungen (z.B. Kolonie-Bildung, Antikörperproduktion), nicht aber zytologisch erfaßt werden. Ein Transfer ist andererseits aber auch in sog. Diffusionskammern möglich, die mit ihrem Zellinhalt intraperitoneal dem Wirt implantiert werden. Hier kommt nicht nur eine Messung der Endleistung des Inokulums, sondern auch seine zytologische Erfassung infrage (5, 27). Unabhängig aber vom Übertragungsmodus besteht zwischen Endleistung und Zahl der dafür verantwortlichen Zellen eine quantitative Beziehung, die durch Vorversuche (Anlegen einer Art Eichkurve) bestimmt werden kann und es ermöglicht, Zahl sowie Effizienz der übertragenen Zellen zu ermitteln. So ist z.B. bei in vivo-Kultur zweitexponierter "memory Cells" eine direkte Proportionalität zwischen Stationärphasen-(8-Tage-) Titer und Stammzellzahl gesichert (30, 31).

Aufgabe des Wirtes ist es bei der in vivo-Kultur lediglich, das übertragene Zellmaterial zu ernähren, nicht aber etwa mitzureagieren. Um letzteres als Störfaktor auszuschalten, ist es z.B. bei Prüfung immunologischer Leistungen notwendig, den Wirt vorab immunologisch zu inaktivieren, was mittels proliferationshemmender Agentien wie Zytostatika oder Strahlen möglich ist. Eine Ausnahme machen hier die determinierten immunologischen Stammzellen. Ihre Leistung besteht in einer Antikörperproduktion vom "booster"-Typ, die zu beliebiger Zeit durch eine Zweitdosis des spezifischen Testantigens abrufbar ist und sich zudem durch Stärke und Geschwindigkeit von einer primären Mitreaktion des (nichtsensibilisierten) Wirtes abhebt. Insofern kann im Falle der determinierten immunologischen Stammzellen, anders etwa als bei CFU oder

nichtdeterminierten immunologischen Stammzellen, ein Transfer auch auf nicht oder nur geringfügig strahlen- bzw. zytostatikavorbehandelte Wirte erfolgen.

Im vorliegenden Falle wurden Milzzellen von Mäusen untersucht, die mit dem Testantigen Schaferysthrozyten sensibilisiert worden waren und auf dieses Antigen festgelegte Stammzellen enthielten. Die Zellen wurden zusammen mit einer Zweitdosis des Antigens auf die mehr oder minder vorbehandelten Wirtstiere übertragen und konnten in ihnen eine immunologische Zweitreaktion entwickeln. Der acht Tage nach Transfer, also in der immunologischen Stationärphase, nachweisbare Antikörpertiter im Serum der Wirtstiere konnte als Maßstab für die Zahl bzw. die Effizienz bzw. Angehquote spezifischer immunologischer Stammzellen gewertet werden (20, 30, 31). Hieraus ließen sich Rückschlüsse auf die Bedeutung der konditionierenden Empfängervorbehandlung für das Schicksal des Transplantates ziehen. Im Sonderfall der Diffusionskammermethode wurden Zellen und Antigen innerhalb der Kammer übertragen. Die Eigenschaften der Kammermembran erlaubten jedoch einen unbehinderten Austritt fallweise gebildeter Antikörper in die Peritonealhöhle und damit in die Zirkulation des Wirtes, so daß ein getreues Bild von der Zelltätigkeit sowohl durch Untersuchung des Empfängerserums als auch durch Untersuchung des Kammerliquors zu gewinnen war.

### 3.3 Intravenöser Transfer (Abb. 1)

#### 3.3.1 Z e l l z u b e r e i t u n g   u n d   - t r a n s f e r :

Voruntersuchungen hatten ergeben, daß die Effizienz der übertragenen Zellen keinen Schaden leidet, wenn bei ihrer Aufarbeitung lediglich "saubere", nicht aber sterile Bedingungen eingehalten werden. Dies dürfte durch die einer Milzzellsuspension inhärenten bakteriziden Eigenschaften zu erklären sein sowie durch die Tatsache, daß bei Transfer alsbald nach Zellzubereitung analoge Leistungen auch des Empfängers zum Tragen kommen. Dementsprechend wurde bei der Milzaufarbeitung verfahren. Die Spendertiere wurden dekapitiert, in rechte Seitenlage gebracht und über der linken Körperhälfte mit 70%igem vergällten Alkohol desinfiziert. Sodann wurde die Haut mit einer Pinzette leicht angehoben, inzidiert und mit Daumen und Zeigefingern nach kranial bzw. kaudal so auseinandergezogen, daß die Bauchdecken gänzlich freilagen. Nach ihrer Inzision im Bereich der dunkel durchschimmernden Milz konnte das Organ mit einer feinen chirurgischen Pinzette herausgehoben, mit einem Scherenschlag gelöst und in eine Petrischale verbracht werden. Die Aufarbeitung der Milzen erfolgte auf einem Eiswasserbad mit Pinzette und nadelbewehrter (Größe Nr. 1) Injektionsspritze, aus der kontinuierlich kleinste Menge kühler 0,9%iger NaCl-Lösung zugegeben wurden, während Pinzette und Nadel die Milz zerzupften. Schließlich blieben von den Milzen lediglich Bindegewebsbröckel in einer rötlichen Zellsuspension zurück. Diese wurde durch ein nicht rostendes Stahlsieb gegeben, welches gröbere Zellkomplexe eliminierte. Nach Doppelbestimmung des Anteils kernhaltiger Zellen mit Hilfe der

Schilling-Kammer erfolgte ihre Einstellung auf eine Endkonzentration imc ml von  $5,0 \times 10^7$  für den intravenösen Transfer bzw.  $1,2 \times 10^8$  für den Transfer in der Kammer.

Für den intravenösen T r a n s f e r wurden vorbehandelte Empfängermäuse etwa 10 Min. aus etwa 30 cm Distanz mit einer 100 W-Lampe bestrahlt. Hierdurch konnte eine Hyperämisierung erzielt werden, die die Injektion des Inokulums (Tuberkulinspritze mit Nadel Nr. 20) in die Schwanzvenen der Tiere erleichterte. Jedem Tier wurde 0,5 ml Milzszellsuspension (äquivalent zu  $2,5 \times 10^7$  kernhaltigen Zellen) sowie 0,5 ml Antigenlösung (entsprechend  $2,5 \times 10^8$  Schaferthrombozyten) verabfolgt.

### 3.3.2 S e r u m g e w i n n u n g u n d - t i t r a t i o n :

Acht Tage nach Zelltransfer, sofern der Versuchsansatz es nicht anders erforderlich machte, wurden die Empfänger durch Dissektion der Zervikalgefäße getötet und das abfließende Blut (durchschnittlich 0,4 ml) in Uhlenhutröhrchen aufgefangen, die während der anschließenden Gerinnung horizontal lagerten. Nach Abschluß der Gerinnung und Zentrifugieren der Röhrchen für 10 Min. bei 2.500 U/min. ergaben sich durchschnittlich 0,2 ml Serum. Die Seren eines Versuches wurden in einer Sitzung serologisch gearbeitet und bis zu diesem Zeitpunkt tiefgefroren verwahrt.

Zur A n t i k ö r p e r t i t r a t i o n mit der doppelten Serienverdünnungsmethode (26) wurde eine Reihe Rundbodenröhrchen (70 x 8 mm) mit 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung beschickt und in ihr 0,1 ml

Serum unter Verwendung von Blutzuckerpipetten titriert. Nach Zusatz von 0,1 ml 1%iger Schaferythrozyten-Lösung, Durchmischen, 5 Min. Inkubation bei Zimmertemperatur, 2 Min. Zentrifugieren bei 1.800 U/min. lasen wir unter vorsichtigem Aufschütteln des Bodensatzes ab. Die höchste Verdünnungsstufe mit einer makroskopisch noch sicheren Agglutination stellte den Titer des untersuchten Serums dar ( $\log_2$ -Titer =  $\log_2$  des reziproken Wert des Titers). Die für die Titration benutzte Schaferythrozytensuspension wurde durch volumenweise Mischung von 1 Vol. gepackter Erythrozyten mit 99 Vol. 0,9%iger NaCl-Lösung gewonnen. Mit einem Standardserum bekannter Stärke prüften wir von Sitzung zu Sitzung die Konstanz ihrer antigenen Eigenschaften.

### 3.3.3 Statistische Aufarbeitung:

Die Versuchsergebnisse wurden in Tabellen bzw. Kurven zusammengestellt. Aufgetragen wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) mit einem Vertrauensbereich ( $2 P = 0,05$ ). Die Signifikanz von Unterschieden verschiedener Stichproben prüften wir im t-Test (5 %-Niveau). Bei den statistischen Arbeiten wurden die wissenschaftlichen Tabellen, Dokumenta Geigy (8), zur Hilfe genommen.

### 3.4 Transfer in Diffusionskammern (Abb. 1):

Die in vivo-Kultur in Diffusionskammern folgt im Prinzip den soeben geschilderten Linien. Eine Besonderheit ist lediglich die Transfer-Technik, auf die daher nun einzugehen ist (5).

H e r s t e l l u n g d e r K a m m e r n: Da Diffusionskammern kommerziell nicht erhältlich sind, mußten wir sie selbst aus Plexiglasringen und Filtermembran herstellen. Zur Verwendung kamen Plexiglasringe folgender Dimensionen: Außendurchmesser 20 mm, Innendurchmesser 10 mm, Dicke 3 mm, inneres Volumen 0,24 ml. Eine seitliche Bohrung ermöglichte das Einbringen des Inokulums in die fertige Kammer. Die Ringe wurden zunächst während 30 Min. gründlich mit Waschmittel und Benzin gereinigt, dann 5 Std. gewässert und schließlich getrocknet. Zum Auftragen der Filtermembranen wurde ein Klebstoff benutzt, der durch Lösen von Plexiglasspänen in Azeton hergestellt wurde. Das Auftragen des Klebstoffes erfolgte mit einer 5 ml-Spritze, die mit einer Kanüle Nr. 1 versehen war. Während Arbeitspausen erwies es sich als zweckmäßig, die leere Spritze mit Azeton aufgezogen in eine mit Azeton gefüllte Petrischale zu verbringen. Beidseits auf den Ringen wurden Filtermembranen aufgetragen, deren mittlere Porenweite 0,1  $\mu$  betrug (Millipore Filter Corp. Typ VC). Besondere Aufmerksamkeit wurde darauf gelegt, daß die Membranen glattrandig mit Klebstoff fixiert wurden und weder am Kleberand (durch knappes Auftragen von Klebstoff) noch in der Fläche (durch Läsion während des Produktionsvorganges) Undichtigkeiten besaßen. Vor Gebrauch erfolgte eine Heißluftexposition bei 80°C während 12 Std. Das Inkubat,  $1,2 \times 10^7$  sensibilisierte Milzzellen sowie  $1,2 \times 10^6$  Schaferythrozyten, jeweils in 0,1 ml enthalten, konnte schließlich durch die seitliche Bohrung mit Hilfe einer nadelbewehrten Injektionsspritze eingebracht werden. Der Schluß

der Bohrung erfolgte zunächst mit Paraffin, das an einer erhitzten Nadel in die Bohrung eingetropft wurde, und schließlich mit Plexiglas-Klebstoff.

Die K a m m e r i m p l a n t a t i o n erfolgte in intravenöser Pentobarbital-Narkose. Hierzu wurden die Tiere, wie schon geschildert, hyperämisiert und intravenös mit 0,2 ml 1 : 10 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünntem Nembutal<sup>(R)</sup> versehen (Nembutal<sup>(R)</sup> Abbot, Inj.Fl. 50 mg Pento-barbital Natrium/ml). Die Narkosedauer betrug hierunter durchschnittlich 30 Min.; nur ausnahmsweise kam es zu Todesfällen. Die narkotisierten Tiere wurden mit dem Rücken auf eine Korkplatte gelegt, die Extremitäten maximal extendiert und mittels Nadeln auf der Korkplatte fixiert. Nach Alkoholreinigung der Bauchhaut wurde das Fell in diesem Bereich mit Hilfe einer einfachen Rasierklinge sauber abgetragen, die Haut mit einer chirurgischen Pinzette angehoben, in Längsrichtung etwa 2 cm inzidiert und sodann mit der Bauchdeckenmuskulatur gleichermaßen verfahren. Durch die sich ergebende Öffnung wurde die Kammer in die Peritonealhöhle eingeführt und sodann Bauchdecken sowie Haut mit einer durchgreifenden fortlaufenden Naht verschlossen. Sofern es überhaupt zu einer nennenswerten Blutung gekommen war, bewirkte die Naht ihr Sistieren. Ebenso wie die Zellzubereitung erfolgte die Kammerimplantation bei Diffusionskammerversuchen in Anbetracht des Umfangs der erforderlichen Operation unter semisterilen Bedingungen. So lag die Mortalität unter den kammertragenden Tieren bei maximal nur 10 %.

Eigenschaften der Kammern:  
Eigene sowie Voruntersuchungen anderer Autoren haben gesichert, daß 1.) unter den gewählten Materialbedingungen ein aktiver oder passiver Zelldurchtritt in bzw. aus der Kammer heraus nicht möglich ist und daß 2.) die Porenweite der Kammermembran einen raschen Flüssigkeitsaustausch zwischen Kammerinnenraum und Peritonealhöhle/Zirkulation des Wirtes ermöglicht. Dies garantiert optimale Kulturbedingungen und zum anderen, daß Antikörper, die innerhalb der Kammer gebildet werden, praktisch ohne zeitliche Verzögerung in der Zirkulation des Wirtes nachweisbar werden. Schließlich, und dies war uns wesentlicher Anlaß für den Einsatz der Kammertechnik, boten die Kammern hinsichtlich "space" sowie Mikromilieu konstante, von der Empfängervorbehandlung unabhängige Bedingungen. Auf die Bedeutung dieses Faktors wird bei der Besprechung der Versuchsergebnisse noch einzugehen sein.

### 3.5 Empfängervorbehandlung:

Strahlenvorbehandlung: Mäuse wurden in einem flachzylindrischen, radial in 12 Einzelabteile gegliederten Plexiglasbehälter (Höhe 7 cm, Durchmesser 20 cm) eingesetzt. Mit diesem Spezialkäfig rotierten die Tiere während der Strahlenexposition um eine Vertikalachse. Die Strahlenbehandlung erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn (Müller RT 250-Gerät des Strahleninstitutes der Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg; 250 kv, 15 mA, 1,5 mm Cu, Feldgröße 10 x 15 cm, Focus-Haut-Abstand 50 cm, Dosisrate 90 r/min.).

Mit Hilfe einer subletalen Vorbestrahlung in Höhe von 750 r ( $LD_{50/30}^1 = 733$  r) (20) konnte nach dem Ergebnis entsprechend angelegter Vorversuche eine sichere Strahleninaktivierung des Wirtes erzielt werden. Die für die Applikation von 750 r benötigte Bestrahlungsdauer belief sich auf 8 min 20 sec. Wo der Versuchsplan andere Strahlendosen erforderlich machte, wurde die Expositionszeit entsprechend geändert.

**Vorbehandlung mit Cyclophosphamid:** Für die Cyclophosphamid-Vorbehandlung wurde das Präparat Endoxan<sup>(R)</sup> der Asta-Werke AG, Brackwede, (Inj.Fl. 500 mg Trockensubstanz) benutzt. Nach unveröffentlichten Untersuchungen (20) betrug die intraperitoneale  $LD_{50/30}^1$  unserer Versuchstiere für diese Substanz 550 mg/kg. Die Empfängervorbehandlung mit Cyclophosphamid erfolgte 4-6 Std. vor Zelltransfer. Erst nach Ablauf dieses Zeitintervalls konnte nämlich eine Schädigung des Inokulums durch noch zirkulierendes Cyclophosphamid bzw. dessen Metaboliten sicher ausgeschlossen werden. Bei einem Durchschnittsgewicht von 30 g betrug die einer  $LD_{50/30}^1$  entsprechende Einzeldosis je Tier 16,5 mg (1,0 ml Volumen).

#### 4. VERSUCHSTEILE und ERGEBNISSE

##### 4.1 Prüfung des Effektes einer Empfängervorbehandlung:

In einer Reihe stichprobenartiger Versuchsansätze wurde geprüft, welchen Effekt eine radiologische Empfängervorbehandlung grundsätzlich auf die Leistung eines im Anschluß an die Vorbehandlung intravenös verabfolgten Standardinokulums (sensibilisierte, genetisch-verträgliche Milzzellen + Zweitdosis Testantigen) ausübt. Verglichen wurden die Stationärphasen-Titer nach Transfer des Standardinokulums in Tiere, die mit 0 r oder 750 r (= 1 LD<sub>50</sub>) vorbehandelt worden waren. Da es sich hierbei um grob orientierende Ansätze handelte, sollen lediglich die beobachteten Tendenzen aufgezeigt werden. Ganz eindeutig bereitete die Strahlenvorbehandlung einer Steigerung der Leistung des eingegebenen Inokulums den Weg. Die Titerdifferenz der 750 r - gegenüber den 0 r-Wirten betrug zwischen 4 und 5, in einem Ausnahmefall sogar mehr als 6 log<sub>2</sub>-Titerstufen entsprechend einer Leistungszunahme um einen Faktor von etwa 15-30. Gleichsinnige Ergebnisse können den Tab. 1, 2, 3, 5 entnommen werden.

Eine subletale Strahlenvorbehandlung an hämatologisch gesunden Empfängern begünstigt das Angehen oder die Vermehrung oder die Effizienz genetisch identischer, immunologisch determinierter Stammzellen. Die Empfänger werden im Sinne der deutschen Übersetzung des in diesem Zusammenhang oft angewandten englischen Terminus ("conditioning") "in Form gebracht", "hergerichtet". Insofern erscheint es gerechtfertigt, diesen radiologischen Therapieeffekt in der Folge als

Konditionierung bzw. Konditionierungseffekt zu bezeichnen.

- 4.2 Dosis-Wirkung-Beziehung der radiologischen Empfänger-konditionierung: Nach den soeben erwähnten orientierenden Versuchen wurde das Konditionierungsphänomen systematisch untersucht, wobei als erstes der Dosis-Wirkungs-Beziehung Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Mäuse in Gruppen von 10-15 Tieren erhielten unter definierten Bedingungen eine Röntgenganzkörperbestrahlung, die von Gruppe zu Gruppe abgestuft war hinsichtlich der Dosis: 0 r, 95 r, 190 r, 375 r, 750 r (= 1 LD<sub>50</sub>), 1.050 r. Anschließend erhielten sämtliche Tiere ein intravenöses Standardinokulum bestehend aus sensibilisierten Milzzellen sowie einer Zweitdosis Testantigen. Am 8. Tag der in vivo-Kultur wurde von den Wirtstieren Serum gewonnen und auf spezifische Agglutinine untersucht.

Aufgrund des Zelltransfers kam in nichtvorbestrahlten Empfängern ein Sekundärtiter in Höhe von  $17.2 \pm 1.3$  zustande. Während der entsprechende Wert der 95 r-Gruppe von diesem Kontrollwert nicht nennenswert differierte, lag er in der 190 r-Gruppe um eine Titerstufe höher, was allerdings auf dem 5 %-Niveau nicht signifikant war. Erst eine Vorbehandlung mit 375 r zeitigte eine signifikante Konditionierung von  $19.1 \pm 0.7$ . 750 r bewirkten ein Anwachsen des 8 Tage-Titers gegenüber der 0 r-Gruppe um fast 4 Titerstufen, d.h. etwa um den Faktor 10-15. Bemerkenswerterweise vermochten 1.050 r diesen Effekt nicht weiter zu verstärken. Das Ergebnis des Versuchsansatzes konnte durch Kontrollen tendenziell bestätigt werden, wobei lediglich die Strahlendosis,

die zuerst eine im t-Test signifikante Abweichung gegenüber der 0 r-Gruppe induzierte, variierte (190 bis 375 r).

Durch den Versuch konnte bestätigt werden, daß eine Strahlenvorbehandlung von hämatologisch gesunden Empfängern die anschließend durchgeführte Transplantation genetisch identischer, immunologisch determinierter Stammzellen begünstigt. Es zeigte sich, daß dieser Konditionierungseffekt von einer Schwellendosis um 190-375 r an (entsprechend  $1/4-1/2 LD_{50}$ ) dosisabhängig zunimmt. Eine optimale Empfängerkonditionierung wurde durch 750 r (entsprechend  $1 LD_{50}$ ) bewirkt. Strahlendosen, die beim  $1\frac{1}{2}$ fachen dieser Dosis lagen, zogen keine weitere Titersteigerung nach sich.

#### 4.3 Empfängerkonditionierung durch Strahlen und Zytostatika:

Angesichts der ähnlichen biologischen Wirkungsrichtung, die Röntgenstrahlen und sog. radiomimetische Substanzen von Zytostatikacharakter besitzen, lag es nahe, auch diese auf eine eventuelle konditionierende Wirkung zu untersuchen. Eines der verbreitetsten Zytostatika, Cyclophosphamid (Endoxan<sup>(R)</sup>), wurde geprüft. Von vornherein waren die Versuche nicht nur darauf abgestellt, ob Cyclophosphamid überhaupt eine konditionierende Wirkung entfaltet; es wurde auch die Dosis-Wirkungs-Relation und ferner die Frage geprüft, ob der Konditionierungseffekt von Röntgenganzkörperbestrahlung bzw. intraperitonealer Cyclophosphamidgabe auf der Basis äquitoxischer Dosen quantitativ vergleichbar ist.

Gruppen von 10-15 Mäusen erhielten teils keine Vorbehandlung, teils eine Vorbehandlung mit Cyclophosphamid

intraperitoneal bzw. Röntgenganzkörperbestrahlung in Dosen, die 1, 1/2, 1/4 bzw. 1/8 LD<sub>50</sub> entsprachen. Anschließend wurde ein Standardinokulum bestehend aus sensibilisierten Milzzellen und einer Zweidosis Testantigen übertragen. Seine Leistung unter den verschiedenen Bedingungen der Empfängerbehandlung wurde gemessen am 8 Tage-Titer spezifischer Agglutinine.

Wie schon bei den Voruntersuchungen (Punkt 4.2) hatte eine Vorbehandlung mit weniger als 1/2 LD<sub>50</sub> sowohl bei Röntgenganzkörperbestrahlung als auch bei intraperitonealer Cyclophosphamidinjektion kein eindeutiges konditionierendes Resultat. Als repräsentativ in Tab. 2 aufgetragen sind die Ergebnisse aus jenen Gruppen, für die eine Konditionierung zu sichern war. 1/2 LD<sub>50</sub> Ganzkörperbestrahlung bzw. Cyclophosphamid bewirkte gleichermaßen verglichen mit der Kontrollgruppe einen Anstieg des 8 Tage-Titers um 2-3 Titerstufen. 1 LD<sub>50</sub> hatte sowohl in der Cyclophosphamid- als auch in der Strahlengruppe eine Effizienzsteigerung um etwa 5 Titerstufen entsprechend einem Faktor von etwa 30 zur Folge. Die einander entsprechenden Werte beider Behandlungsarten zeigten untereinander im t-Test ( $2P < 0.05$ ) keine signifikante Differenz.

Dem Versuchsergebnis ist zu entnehmen, daß Strahlen wie Zytostytikum gleichermaßen eine Empfängerkonditionierung bewirken, wobei allem Anschein nach der konditionierende Effekt auf äquitoxischer Basis einander ähnelt.

4.4 Ausschluß einer Allotransplantatreaktion: Zwar wurden die in unseren Versuchen benutzten Tiere in eigener Zucht unter entsprechenden Kautelen gewonnen, dennoch hätte eingewandt werden können, daß die beobachtete "Konditionierung" lediglich Folge einer Suppression immunologischer Abwehrmechanismen (Wirt gegen Inokulum) war. Ein solcher Abstoßmechanismus gewinnt in dem Maße an Stärke, in dem der Wirt vor Zelltransplantation mit Antigenen der Zellspender Bekanntschaft machen konnte. Gewebeunverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger müßte sich demnach besonders intensiv bei Transferversuchen an Empfängern bemerkbar machen, die zuvor mit Zellantigen eines breiten Pools von Zellspendern vorbehandelt wurden.

In Anlehnung an CELADA (6) inaktivierten wir gepoolte normale Milzzellen von C31 F<sub>1</sub>-Mäusen beiderlei Geschlechts in vitro mit 3.000 r. Einer Gruppe von C31 F<sub>1</sub>-Tieren injizierten wir intraperitoneal  $2.0 \times 10^7$  dieser Zellen in der Absicht, die Empfänger gegen okkulte H2-Antigendifferenzen zu immunisieren. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich Injektionen von Kochsalzlösung. Sieben Tage später empfangen beide Gruppen ohne Vorbestrahlung das Standardinokulum bestehend aus sensibilisierten Milzzellen und einer Zweitdosis Testantigen. Nach 8 Tagen in vivo-Kultur wurde im Blut der Tiere beider Gruppen der Titer des antigenspezifischen Antikörpers ermittelt.

Dieser lag mit  $14.1 \pm 0.9$  ("sensibilisierte" Gruppe) bzw.  $14.2 \pm 0.9$  (NaCl-Gruppe) in einem Bereich, der für nichtkonditionierte Empfänger typisch ist.

Im Falle einer tatsächlich ausgelösten Sensibilisierung gegen differente Gewebsmerkmale wäre aber zu erwarten gewesen, daß dieser Titer in der "sensibilisierten" Gruppe signifikant unter demjenigen der Vergleichsgruppe gelegen hätte, wenn es überhaupt in dieser Gruppe zu einer Antikörperbildung gekommen wäre. Dies war aber nicht der Fall.

Das Ergebnis dieses Versuches erlaubt mit Sicherheit, eine immunologische Begründung des zuvor herausgestellten Konditionierungsphänomens auszuschließen.

- 4.5 Grundlage der Empfängerkonditionierung: Es stellte sich nunmehr die Frage, auf welchem Wege das Phänomen der Empfängerkonditionierung zustande kommt. Hierbei und bei den darauffolgenden Untersuchungen wurde wegen der pharmakokinetischen Probleme, die die Arbeit mit Cyclophosphamid mit sich bringt, stets eine Röntgen-ganzkörperbestrahlung vorgenommen. Grundsätzlich ließ die Qualität unseres Tiermaterials, insbesondere nach entsprechender experimenteller Absicherung (Punkt 4.4), ausschließen, daß der Konditionierungseffekt Folge einer erfolgreichen Tumorrepression oder Immunsuppression sein kann; die Tiere waren, wie schon bemerkt, hämatologisch gesund und zudem genetisch identisch.

Raumfaktor: Vielmehr war daran zu denken, daß auch die Eradikation normalen Zellmaterials in den Geweben, in denen das Transplantat sich vorzugsweise ansiedelt (hämo-poetische Organe; "homing instinct!"), dessen Anhequote begünstigen würde. Dieser grob räumlich

denkenden Betrachtungsweise etwa an die Seite zu stellen war das Postulat, daß die Vorbestrahlung durch eine Umstimmung des lokalen Mikromilieus am Nidationsort einen begünstigenden Effekt auslösen könne.

Humorale Faktoren: Zum anderen mußte die Möglichkeit bedacht werden, daß durch die Vorbehandlung fördernde humorale Faktoren der verschiedensten Qualität freigesetzt oder natürlicherweise vorkommende Inhibitoren eliminiert werden. Beides könnte den Konditionierungseffekt erklären.

Zunächst wurde versucht, den Strahleneffekt auszulöschen unter Inanspruchnahme des eben freigewordenen Raumes durch eine "Plethorisierung" des bestrahlten Wirtes mit hohen Dosen isogener, nicht-immunisierter Milzzellen, vorgeschaltet vor die Gabe des Inokulums. Dem blieb ein verwertbares Ergebnis versagt. Nicht viel glücklicher verliefen Versuche, den Konditionierungseffekt auf unbestrahlte Empfänger zu übertragen durch Implantation lymphatischer Organe, durch Injektion entsprechender Organaufbereitungen oder durch Übertragung gepoolter Seren von strahlenkonditionierten isogenen Tieren. Eine entscheidende Aussage brachte erst der Einsatz der Diffusionskammermethode.

Optimale Inokula von sensibilisierten Milzzellen und einer Zweitdosis Testantigen (vgl. Tab. 3) wurden teils direkt intravenös, teils in Kammern intraperitoneal übertragen. Die Empfänger waren teils soeben mit 750 r, teils nicht vorbehandelt. Bei intravenöser Übertragung bewirkte die Vorbestrahlung, wie üblich,

einen Aktivitätszuwachs von 4.7 Titerstufen. Entscheidend war aber, daß auch die Kammergruppe ein derartiges Plus aufwies, mit 4.2 Titerstufen nur unwesentlich von dem der intravenösen Gruppe different. Die Differenzen der 0 r- sowie 750 r-Werte waren bei beiden in vivo-Kultur-Methoden im t-Test (hoch) signifikant ( $2P \ll 0.001$ ).

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es statthaft, einen Raumfaktor und Veränderungen des Mikromilieus aus der Diskussion der Grundlagen der Strahlenkonditionierung auszuklammern, da, wie schon erwähnt, Diffusionskammern in dieser Hinsicht konstante Bedingungen bieten. Vielmehr scheint der Konditionierungseffekt humoralen Faktoren zu verdanken zu sein.

- 4.6 Erforderliche Einwirkdauer des Konditionierungsfaktors: Für weitere kinetische Untersuchungen des Konditionierungsfaktors war Klarheit notwendig über denjenigen Zeitraum, der erforderlich ist, um einen optimalen Konditionierungseffekt an einem gegebenen Zellinokulum zu setzen. Hierzu wurden Diffusionskammer-Untersuchungen im Doppeltransfersystem vorgenommen. Mäuse erhielten eine konditionierende Vorbestrahlung in Höhe von 750 r. Unmittelbar anschließend wurden ihnen Kammern implantiert, die ein im Rahmen der Kammertechnik optimales Inokulum aus sensibilisierten Milzzellen und Zweitdosis Testantigen enthielten. Die Kammern verblieben im bestrahlten Primärwirt unterschiedlich lange Zeiten: 12, 24, 48 sowie 72 Std. Anschließend wurden die Primärwirte getötet, die Kammern entnommen und intraperitoneal

auf nichtvorbestrahlte Sekundärwirte übertragen. Eine Kontrollgruppe nichtvorbestrahlter Mäuse erhielt Kammern, welche überhaupt nicht über einen vorbestrahlten Primärwirt gelaufen waren. Nach 12 Tagen in vivo-Kultur wurden die Sekundärwirte getötet und ihr Blut zur serologischen Aufarbeitung gewonnen.

Schon 12 Std. Verweildauer im Primärwirt bewirkte (Tab. 4) eine optimale Konditionierung des Kammerinhalts (Anstieg seiner Effizienz um etwa  $3 \log_2$ -Titerstufen entsprechend einem Faktor von etwa 10. Längere Verweilzeiten im Primärwirt brachten keine signifikant besseren Ergebnisse.

Es zeigte sich somit, daß die strahlenbedingte Empfängerconditionierung einem humoralen Faktor zuzuschreiben ist, der seine Wirkung innerhalb kurzer Zeit, genauer innerhalb von weniger als 12 Std. voll auf sensibles Zellmaterial zu übertragen vermag. Darüber hinaus ist dieser Versuchsansatz aber auch geeignet, eine Entscheidung zwischen der Frage zu treffen, ob die Strahlenvorbehandlung des Empfängers entweder konditionierende Faktoren freisetzt oder Inhibitoren eliminiert. Die Tatsache, daß die Empfängerconditionierung sich auch im nichtvorbestrahlten Zweitwirt entfalten konnte, weist stark darauf hin, daß sie im wesentlichen stimulierenden Faktoren zu verdanken ist. der im nichtvorbestrahlten Sekundärwirt noch vorhandene Inhibitor hätte nämlich andernfalls die im Primärwirt bewirkte Konditionierung auslöschen müssen.

- 4.7 Kinetik des Konditionierungsfaktors: Durch diese Ergebnisse wurde die Interpretation von Versuchen, die sich mit der Kinetik des konditionierenden humoralen Agens beschäftigten, wesentlich erleichtert.

Gruppen von Mäusen erhielten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation von 750 r Ganzkörperbestrahlung ein intravenöses Standardinokulum bestehend aus sensibilisierten Milzzellen und einer Zweitdosis Testantigen. Nach 8 Tagen in vivo-Kultur wurde aus dem Blut der Empfänger der spezifische Antikörpertiter ermittelt. Seine Veränderung war als Ausdruck des zeitabhängigen Verhaltens des Konditionierungsfaktors zu werten. Grundsätzlich bestanden für die Durchführung dieses Versuches zwei Möglichkeiten. Einmal konnte ein Pool von Empfängertieren simultan bestrahlt werden und ihnen sodann das Standardinokulum zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung appliziert werden. Da die Haltbarkeit von Milzzellzubereitungen, wie wir sie benutzten, begrenzt ist (bei +4<sup>o</sup> maximal 2-3 Tage) (32), hätte dies bedeutet, daß zu jedem der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte Milzzellsuspension und Antigenlösung hätte separat hergestellt werden müssen. Dies bedeutet aber, beginnend mit der Qualität der Spendertiere und endend mit der Technik der Milzaufarbeitung, die Inkaufnahme so erheblicher Störfaktoren, daß wir den Alternativweg einschlugen. Aus einem Pool von Mäusen wurden Gruppen von Empfängern zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor Zeitpunkt 0 = Versuchsbeginn bestrahlt, wobei als gesichert vorausgesetzt wurde, daß die Strahlentechnik

eine hohe Konstanz der Empfängervorbehandlung gewährleistete. Die Reproduzierbarkeit der erzielten Versuchsergebnisse bestätigte diese Annahme.

Auffallend war auch hier die konditionierende Wirkung einer unmittelbar vor Zelltransfer durchgeführten Bestrahlung (Tab. 5): Titer ohne Bestrahlung  $15.5 \pm 0.6$ , Titer nach Transfer unmittelbar nach Bestrahlung  $20.5 \pm 0.5$  entsprechend einer Leistungssteigerung um den Faktor 30. Schon 1 Tag Zeitintervall zwischen Vorbestrahlung und Zelltransfer beeinträchtigte die Strahlenwirkung drastisch, indem der Leistungszuwachs hier nur noch knapp 3  $\log_2$ -Titerstufen betrug ( $18.3 \pm 1.6$ ) entsprechend einem Leistungsplus vom Faktor 5-10. Bei Zeitintervallen von 7-9 Tagen war der Konditionierungseffekt statistisch nicht mehr zu sichern. Die biologische Halbwertszeit des konditionierenden Agens ließ sich aufgrund dieser Versuche auf ca. 3 Tage berechnen (Abb. 2).

Der günstigste Zeitpunkt für eine Strahlenkonditionierung liegt demnach unmittelbar vor Zelltransfer. Erhebliche Unterschiede in der Ausprägung des Konditionierungseffektes können, zieht man den Wirkungsabfall innerhalb der ersten 24 Std. in Betracht, sich schon aus geringen Verzögerungen des Zelltransfers ergeben. Konditionierende Zytostatika wie Cyclophosphamid dürften in dieser Hinsicht insofern im Nachteil sein, als ihre Pharmakokinetik mit dem Zelltransfer interferieren kann und einen Unsicherheitsfaktor darstellt.

Sie zwingt dazu, den Zelltransfer etliche Stunden nach Applikation des Zytostatikums durchzuführen, zu einem Zeitpunkt also, zu dem der Konditionierungseffekt u.U. schon im Abklingen begriffen ist.

- 4.8 Zeitabhängigkeit des Konditionierungseffektes auf Zellebene: Durch den vorangegangenen Versuch war Klarheit über das zeitabhängige Verhalten des Konditionierungsfaktors nach seiner Freisetzung herbeigeführt worden. Offen blieb die Frage, welchen zeitabhängigen Schwankungen die durch diesen Faktor bewirkte Konditionierung auf Zellebene unterworfen ist. Für eine experimentelle Klärung dieser Frage stellten die von uns benutzten immunologisch determinierten oder "memory cells" ein insofern günstiges Testsubstrat dar, als ihre spezifische Leistung durch Zweitdosen Testantigen zu beliebiger Zeit abrufbar ist und andererseits eine so typische Ausprägung besitzt ("booster-Typ"), daß sie unschwer von einer eventuellen primären Mitreaktion des Wirtes abzugrenzen ist.

Gruppen von Mäusen wurden gebildet, die teils unvorbehandelt, teils soeben mit 750 r vorbehandelt worden waren. Zum Zeitpunkt 0 = Versuchsbeginn erhielten sie eine intravenöse Gabe von  $2.5 \times 10^7$  sensibilisierten Milzzellen. Die Reexposition dieser Zellen im Wirtsorganismus erfolgte zeitlich verzögert. Hierdurch wurde bewirkt, daß einerseits Zellen, sofern sie in bestrahlte Wirte gelangten, konditioniert wurden; andererseits hatte dieser Konditionierungseffekt Gelegenheit, im Zeitintervall bis

zur Reexposition abzuklingen. Die (Re)exposition mit dem spezifischen Testantigen erfolgte 1, 2 bzw. 4 Wochen nach Versuchsbeginn. Acht Tage danach wurden die Wirtstiere getötet und aus ihrem Zervikalblut Serum zur Untersuchung auf spezifische Agglutinine gewonnen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 6 niedergelegt. Tiere, die weder mit Strahlen noch mit sensibilisierten Milzzellen vorbehandelt waren, zeigten im Rahmen der bei ihnen durch das Testantigen ausgelösten Primärreaktion am 8. Tag  $\log_2$ -Titer um 9.0. Tiere, die keine Strahlen-, wohl aber eine Vorbehandlung mit sensibilisierten Milzzellen erfahren hatten, produzierten ebenfalls Titerwerte um 9.0, wobei es gleichgültig war, ob die Testantigengabe 1, 2 oder 4 Wochen nach Zelltransfer erfolgte. Anders war die Situation in jener Gruppe, die mit 750 r sowie sensibilisierten Milzzellen vorbehandelt worden war. Hier lagen die erzielten  $\log_2$ -Titerwerte mit 14-15 eindeutig über jenen der nichtbestrahlten Tiere. Daß diese Leistung allein dem Inokulum an sensibilisierten Milzzellen, nicht aber dem Immunsystem des Wirtes zu verdanken war, belegte schließlich das Ergebnis einer Gruppe, die 750 r, keine Milzzellen, wohl aber 1, 2 oder 4 Wochen nach der Bestrahlung Testantigen erhalten hatte. Hier wurden maximale Titerwerte von 1 beobachtet, ein Hinweis darauf, daß die Empfänger-vorbestrahlung mit 750 r zu einer außerordentlich langdauernden immunologischen Areaktivität geführt hatte.

Die Ergebnisse weisen klar aus, daß sensibilisierte Milzzellen nach Transfer auf soeben bestrahlte Tiere konditioniert werden und sich diese Zustandsänderung über Wochen bewahren. Der Konditionierungseffekt erfaßt demzufolge nicht den bestrahlten Wirt als Ganzes, sondern scheint sich auf humoralem Wege auf Zellebene zu entfalten und zu erhalten.

## 5. DISKUSSION

Unter Empfängerconditionierung versteht man Maßnahmen, die vor einer Stammzelltransplantation am Patienten vorgenommen werden, um den Erfolg des Eingriffs zu verbessern. Verbesserung bedeutet hierbei Erhöhung der Angehquote oder, dies scheint offen zu sein, der Effizienz des Inokulums. Sie wird angestrebt durch Einsatz von Strahlen, Zytostatika und neuerdings Antilymphozytenserum (11, 13, 39, 42, 45, 49). Ziel dieser Maßnahme ist nach SANTOS et al. (39), die aktivierten immunkompetenten Zellklone zu zerstören sowie die Zahl der Tumorzellen zu reduzieren. Letzteres kommt im wesentlichen nur im Rahmen der Intensivtherapie maligner Systemerkrankungen von Häm- bzw. Lymphopoese mit nachfolgender Stammzelltransplantation infrage (13). Die Elimination immunkompetenter Empfängerlymphozyten spielt bei Transplantation im allogenen System auch dann eine Rolle, wenn, wie von der Gruppe um VAN ROOD gezeigt wurde, HLA-Identität und sogar MLC-Verträglichkeit erwiesen sind (33). Allerdings dürfte die immunsuppressive Komponente der Empfängerconditionierung bei HLA-identischen, MLC-verträglichen Verwandten, Geschwistern, heterologen und gar homologen Zwillingen in der Reihe der Aufzählung zunehmend an Bedeutung verlieren (9, 33, 35, 41). Dennoch wird, überschaut man die Literatur, auf den massiven Eingriff einer radiologischen oder chemotherapeutischen Empfängervorbehandlung selbst dann

nicht verzichtet, wenn es sich um derart nahe Verwandte und nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse weitgehend gewebsverträgliche Paare handelt (11, 13, 17, 43, 44, 48, 49). Begründet wird dies mit der Tatsache, daß in letzter Zeit an die Seite der sog. Haupt- SD- bzw. LD-Loci Nebenloci getreten sind, die möglicherweise den Methoden der routinemäßig angewandten HLA-Typisierung bzw. MLC-Testung noch entgehen (2, 34, 49). Dies mag wenigstens teilweise erklären, daß die Empfängerconditionierung auch in derart optimal gelagerten Fällen letztlich klinisch vorteilhaft erscheint. Daß sie darüber hinaus positive Wirkungen setzt, die von der Repression eines Tumors ebenso unabhängig sind wie von der Unterdrückung immunologischer Abstoßungsreaktionen, zeigen die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungsreihe.

Im isogenetischen Transfersystem zwischen hämatologisch gesunden Mäusen förderte eine subletale Empfängervorbestrahlung die Effizienz immunologisch determinierter Spenderstammzellen. Dieser Effekt war bei 750 r ( $1 \text{ LD}_{50}^1$ ) maximal (Effizienzvermehrung um den Faktor 10 - 15). Auf äquitoxischer Basis gleich wirkte das Zytostatikum Cyclophosphamid. Die Effizienzsteigerung des Transplantats war nach dem Ergebnis von Transferversuchen mit Diffusionskammern auf humorale Einflüsse, nämlich auf die Freisetzung stimulierender Faktoren im Organismus des Empfängers zurückzuführen. Diese Faktoren erwiesen sich als flüchtig (globale  $t_{1/2} = 2,5$  Tage), aber hinsichtlich der erforderlichen Einwirkungsdauer auf empfängliche

Zellen von rascher Wirkung ( $< 12$  Std.), wobei abschließende Untersuchungen zu dem interessanten Ergebnis führten, daß die hierdurch bewirkte Zustandsänderung auf Zellebene über Wochen persistierte.

Hiernach ist ein weiterer Teilaspekt der sog. Empfängerkonditionierung herauszustellen. Er wurde bei der klinischen Stammzelltransplantation bislang nicht beachtet, obzwar in der Literatur verschiedenartige, auf ihn hinführende Forschungsrichtungen anzutreffen sind.

Bei der Analyse humoraler Regelmechanismen wurde beobachtet, daß die Koloniebildung (CFU) sowie die Granulopoese durch Vorbehandlung des tierischen Organismus mit physiko-chemischen Maßnahmen quantitativ beeinflussbar sind. Bei der Erythropoese, die für die Analyse humoraler Regelmechanismen i.a. exemplarisch ist, konnte Ähnliches mit speziellen Kunstgriffen verifiziert werden. Eine quantitative Beeinflussung der Lymphopoese gelang auch unter Sonderbedingungen nicht. Das Spektrum der Wirkstoffe, denen die beobachteten Effekte zugeschrieben wurden, enthielt einmal spezifische Stimulatoren (CSF; Erythropoietin; Granulopoietin) bzw. Inhibitoren, die durch physiko-chemische Maßnahmen freigesetzt oder gebremst werden sollten; ferner unspezifische Zerfallsprodukte mit teils stimulierender, teils inhibierender Wirkung (3, 4, 10, 18, 22, 23, 24, 29, 40, 53).

Neben humoralen Faktoren sind bei der Erörterung des von uns herausgestellten Konditionierungseffektes

auch das sog. M i k r o m i l l i e u sowie ein simpler R a u m- ("s p a c e"-) F a k t o r zu bedenken. Die Bedeutung des M i k r o - E n - v i r o n m e n t s für das Seßhaftwerden spezieller Zelltypen und die Pathogenese hämopoetischer Systemerkrankungen allgemein konturiert sich gerade im Augenblick immer schärfer. Seine Beeinflußbarkeit durch physiko-chemische Noxen wird unterschiedlich eingeschätzt. Hohe Dosen von Strahlen und Cyclophosphamid führen gleichermaßen zu einer Schädigung des hämopoetischen induktiven Mikromilieus; die fördernden Eigenschaften des Stromas werden hingegen wohl durch Strahlen, nicht aber durch Cyclophosphamid beeinträchtigt (14, 51). Dies ist mit unseren Ergebnissen nicht vereinbar, da diese nicht auf eine Beeinträchtigung, sondern vielmehr auf eine Stimulierung der Effizienz des Inokulums hinwiesen. Darüber hinaus erscheint es grundsätzlich fraglich, ob bei der Arbeit mit organisollierten Zellen innerhalb normierter Kammern ein Mikromilieu im eigentlichen Sinne überhaupt gegeben ist.

Eben dies gilt auch für den sog. "s p a c e"-F a k t o r, der als grob-räumliche Erklärung für das von uns beobachtete Konditionierungsphänomen zu erwägen ist. Er wurde insbesondere durch differentialtherapeutische Untersuchungen aus der Gruppe um SANTOS in die Diskussion gebracht (13, 38, 46, 50). Hierbei wurde das Angehen von Knochenmarktransplantaten abhängig von der Qualität des zuvor applizierten Chemotherapeutikums untersucht. Nach diesen Untersuchungen ließen sich gute bzw. schlechte "space maker"

differenzieren, die jeweils entweder schlechte bzw. gute Immunsuppressiva waren. Als Ergebnis der Untersuchungen wurde die Bedeutung des Raumfaktors bei Knochenmarktransplantationen herausgestellt. In gleicher Richtung weist die rein mechanisch zu verstehende Erscheinung des "crowding-out" (15) von Transplantaten bei rekurrierenden Leukämien. In unserem Falle führte die Empfängervorbehandlung zu einer Leistungssteigerung des Inokulums jedoch unabhängig davon, ob es sich in einem normierten Milieu (Diffusionskammer) oder im gesamten Empfänger entfalten konnte. Der von SANTOS propagierte "space factor" läßt sich hiernach als Ursache des Phänomens ausschließen.

Schließlich ist auf einige atypische Knochenmarktransplantations-Phänomene hinzuweisen, die man neuerdings z.T. unter dem Begriff der "genetischen Resistenz" zusammenfaßt (52). Diese kommen nur bei bestimmten Tierstämmen vor und reifen altersabhängig. Während CELADAs (6) physiologische Barriere deutlich strahlenempfindlich ist, zeigt die genetische Resistenz eine hohe Strahlenresistenz, ist andererseits aber durch Cyclophosphamid beeinflussbar (16). In unserem Experimentalmodell steigerten dagegen Röntgenstrahlen und Cyclophosphamid gleichermaßen die Effizienz des Stammzelltransplantates, ein Faktum, das zumindest mit dem Phänomen der genetischen Resistenz nicht in Einklang zu bringen ist. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen zeigten überdies, daß das von uns beobachtete Konditionierungsphänomen bei einer Vielzahl von Mäuseinzuchtstämmen

und -hybriden in etwa gleicher Intensität sich herbeiführen läßt (20).

Am Eingang der Diskussion wurden als mögliche Grundlagen des Konditionierungsphänomens eine Erhöhung der Angehquote bzw. der Effizienz der transferierten (Stamm-) Zellen genannt. Der Begriff "angehen" weist auf den Vorgang der räumlichen Einordnung des Transplantats in eine für dasselbe primär nicht unbedingt günstige Umgebung hin, eine Umgebung, die u.U. erst sekundär durch therapeutische Maßnahmen zu Gunsten des Inokulums zu modifizieren ist. Dies wäre im wesentlichen grob-räumlich oder über eine Umstimmung des Mikromilieus etwa mit Hilfe der von SANTOS (38) herausgestellten "space maker" vorstellbar. Räumliche Faktoren konnten wir jedoch zu Gunsten humoraler Stimulatoren durch Diffusionskammerversuche ausschließen (vgl. auch 4, 10, 18). Dadurch reduziert sich die eingangs gestellte Frage darauf, wie diese durch die Empfängervorbestrahlung freigesetzten Stimulatoren auf Zellebene wirken mögen.

Dabei ist folgendes zu berücksichtigen. Bei unseren Transferversuchen wurde eine Milzzellsuspension benutzt, die neben immunologisch determinierten Stammzellen (Y-Zellen) alle immunzytologischen Zwischenstufen bis hin zu jenen Terminalzellen enthielt, die den spezifischen Antikörper für das gegebene Testantigen bilden. Grundsätzlich könnte die beobachtete Effizienzsteigerung also durch humorale Beeinflussung der Y-Zellen oder,

ganz auf der anderen Seite, der Terminalzellen in ihrer jeweils spezifischen Leistung (Zellvermehrung; Antikörpersynthese) zustande kommen. Nun kam aber das Konditionierungsphänomen nur dann zur Beobachtung, wenn das Inokulum durch eine Zweitdosis Testantigen zu einer Sekundärantwort veranlaßt wurde. Dies weist eindeutig auf eine Beteiligung der Y-Zellen hin, die für die Induktion einer Sekundärreaktion verantwortlich sind und auf eine Reexposition mit dem Testantigen, dem sie ihre Entstehung verdanken, nur warten. Hingegen unterliegt die Tätigkeit der den Y-Zellen nachgeordneten Formen einem antigenunabhängigen Automatismus. Dies wurde z.B. schon für die Z-Zellen (25, 56) nachgewiesen und gilt erst recht für die antikörperbildenden Terminalzellen.

Somit können alle antikörperbildenden Zellformen unterhalb der Y-Zellebene aus der weiteren Diskussion ausgeschlossen werden. Die weitere Aufmerksamkeit hat allein den Y-Zellen zu gelten.

1. Die einfachste Erklärung für deren Effizienzsteigerung wäre, daß durch die Strahlenvorbehandlung Substanzen freigesetzt werden, die
  - a) diesen Zellen über Schäden hinweghelfen, die sie bei ihrer Organisolierung erlitten, und/oder
  - b) intakten Zellen bis zu ihrer Integration in den jeweiligen Ansiedlungsort Nahrung geben (humorale Protektion im Sinne eines Supplementeffektes).
2. Eine weitere Erklärung wäre, daß Y-Zellen durch die betreffenden Stimulatoren momentan zu erhöhter

Selbstreplikation veranlaßt würden und sodann, in erhöhter Zahl, im Wirt auf eine Reexposition warteten.

3. Schließlich wäre an eine dauerhafte positive Beeinflussung der intrazellulären Regelmechanismen jeder einzelnen Y-Zelle zu denken, mit dem Resultat einer Erhöhung ihrer replikatorischen Fähigkeit nach Abruf.

Da die Generationszeit von Y-Zellen schon normalerweise mit 5 - 6 (55) bzw. 9 - 12 (37) Stunden von extremer Kürze ist, würde der letztgenannte Mechanismus zellphysiologische Leistungen besonderer Art voraussetzen. Zudem beinhaltet er die langfristige Speicherung humoral vermittelter Informationen auf der Ebene der Einzelzelle (4 Wo. Intervall zwischen humoraler Beeinflussung und Abruf der positiv beeinflussten Leistung, Tab. 6). Beides ist ungesichert und wäre durch entsprechende Forschungsergebnisse noch zu belegen. Daher muß Erklärung 3. zumindest vorerst ausgeklammert werden. Die unter 2. aufgeführte Möglichkeit trifft sich mit der bisher ergebnislos diskutierten Frage, ob Y-Zellen noch jene Kardinal-eigenschaft besitzen, die eine echte Stammzelle aufzuweisen hat, nämlich die Fähigkeit zur Selbstreplikation. Dies wird eher angezweifelt (12, 25, 47), so daß Möglichkeit 1. auf dem Ausschlußweg die größte Wahrscheinlichkeit gewinnt. Sie zu bestätigen dürfte experimentell auch am einfachsten sein. Zu denken wäre an analoge Versuche wie die vorliegenden, jedoch unter Verwendung eines Milzzellinokulums, in dem die synthetisierenden immunologischen Terminalzellen durch Strahleninaktivierung von teilungs-

fähigen Vorläufern befreit wurden und ohne weitere Antigengabe im Empfänger Residualtiter aufbauen (20).

Über die klinische Bedeutung der von uns herausgestellten Empfängerconditionierung im engeren Sinne (Abb. 3) kann gegenwärtig noch keine Aussage gemacht werden. Aus praktischen Erwägungen heraus wurde mit einem Zelltyp gearbeitet, der seiner Qualität nach als Bestandteil eines Transplantates dem Empfänger eher Schaden, z.B. in Gestalt einer akuten graft-versus-host-Reaktion, bereiten könnte. Entscheidend wäre, ob das Konditionierungsphänomen auch klinisch bedeutsamen Zellformen wie den CFU zu Gute kommt, und, sofern man nicht a priori eine umständliche Auftrennung des Transplantats vor Transfer im Sinne hat, ob die CFU hierbei gegenüber den Y-Zellen wesentlich begünstigt werden. Erst wenn dies positiv entschieden ist, könnte einer von Immunsuppression und antineoplastischer Therapie unabhängigen Empfängerconditionierung vor Stammzelltransplantation das Wort geredet werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im isogenetischen System wurden immunologisch determinierte Stammzellen (Y-Zellen) zusammen mit einer Zweitdosis Testantigen auf hämatologisch normale Mäuse übertragen, und zwar teils direkt intravenös, teils mit der Diffusionskammertechnik. Geprüft wurde der Effekt einer Empfängervorbehandlung ("Konditionierung") mit Strahlen oder dem Zytostatikum Cyclophosphamid auf die Intensität der vom Inokulum gelieferten Sekundärantwort.

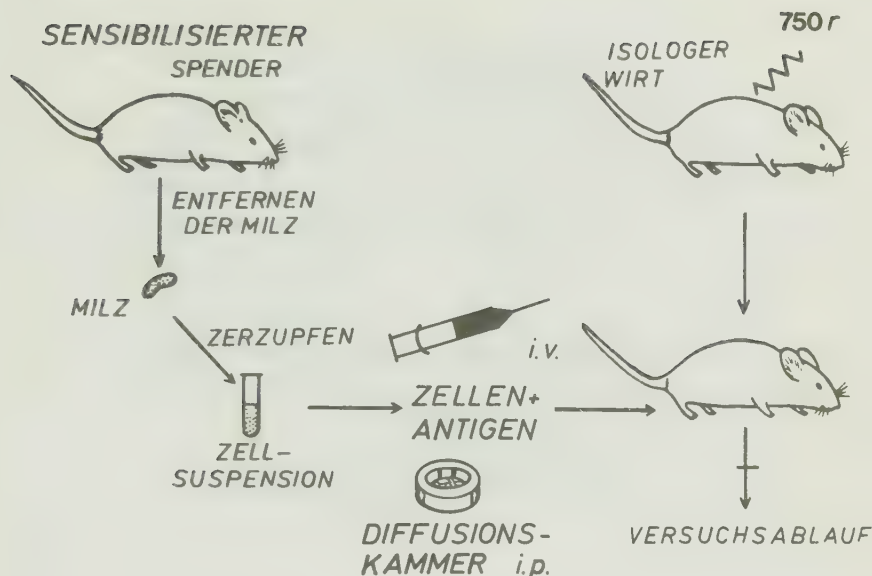
Strahlen wie Cyclophosphamid wirkten auf äquitoxischer Basis gleich. Sie bewirkten eine mit ihrer Dosis wachsende, bei  $1/2 - 1 \text{ LD}_{50/30}^1$  maximale Leistungssteigerung (Faktor 10). Diese konnte mit Hilfe der Diffusionskammertechnik auf flüchtige (globale  $t_{1/2} \sim 2,5$  Tage), rasch (in  $< 12$  Std.) wirkende stimulierende humorale Faktoren zurückgeführt werden. Die durch sie auf Zellebene bewirkte Zustandsänderung persistierte über Wochen, wie durch zeitlich getrennten Transfer von Stammzellen (sofort nach Empfängervorbehandlung) und Zweitdosis Antigen (maximal 4 Wochen später) zu demonstrieren war.

Der von SANTOS geprägte Begriff der Empfängerkonditionierung impliziert im wesentlichen eine Ausschaltung immunkompetenter Zellen (Immunsuppression) und die Reduktion von Tumorzellen (Karzinostase) zu Gunsten des Transplantats.

Diesen beiden Faktoren an die Seite zu stellen ist nunmehr auf Grund der vorgelegten Ergebnisse eine "Konditionierung im engeren Sinne ". Die in ihrem Rahmen freigesetzten humoralen Faktoren wirken vermutlich, indem sie dem Transplantat über Schäden hinweghelfen, die es bei der Organisierung erfuhr, und/oder indem sie intakten Zellen bis zu ihrer Integration am Ansiedlungsort Nahrung geben (humorale Protektion im Sinne eines Supplementeffektes). Da aus technischen Erwägungen mit einem Zelltyp gearbeitet wurde, der empfängerfeindlich wirken könnte (akute graft-versus-host-Reaktion), kann über die klinische Bedeutung des Phänomens noch keine Aussage gemacht werden. Entscheidend wäre, ob klinisch relevante Stammzellen wie die CFU auch und sogar stärker als Y-Zellen von der Konditionierung im engeren Sinne profitieren.

7. A N H A N G

Tabellen und Abbildungen



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der in vivo-Kultur-Methode. Nach intravenöser Übertragung Ansiedlung des Zelltransplantats in allen hierfür geeigneten Empfänger-Organen. Nach intraperitonealer Implantation in Diffusionskammern Ausbreitung des Inokulums in einem normierten, geschlossenen System, in das der Wirt allein auf humoralem Wege einwirken kann. Intravenös übertragene Zellen unterliegen hingegen zusätzlich den Bedingungen am Ansiedlungsort ("space factor"; Mikromilieu). Diese sind ebenso wie die humorale Regulationslage des Wirtes abhängig von seiner Vorbehandlung.

| Empfängervor-<br>behandlung | $\log_2$ -Titer |
|-----------------------------|-----------------|
| 0 r                         | 17.2 $\pm$ 1.3  |
| 95 r                        | 17.8 $\pm$ 0.7  |
| 190 r                       | 18.3 $\pm$ 1.1  |
| 375 r                       | 19.1 $\pm$ 0.7  |
| 750 r                       | 20.9 $\pm$ 1.4  |
| 1050 r                      | 20.6 $\pm$ 1.6  |

Leistungszu-  
nahme um 10  
Faktor

Tab. 1: Der Einfluß einer radiologischen Empfänger-  
vorbehandlung auf die Effizienz  
eines Transplantats immunologisch deter-  
minierter Stammzellen (Inokulum = Y-Zellen  
+ Zweitdosis Testantigen). Maßstab ist die  
vom Inokulum gelieferte immunologische Se-  
kundärreaktion (arithmetisches Mittel der  
8 - Tage - Titer; Vertrauensbereich bei  
2 P = 0.05), Bezugswert die 0 r - Gruppe.  
Ab 375 r kam es zu einer signifikanten  
(2 P < 0.05), bei 750 r zu einer maximalen  
Leistungssteigerung, Leistungszuwachs um  
1  $\log_2$ -Titer ~ Faktor 2, um 4  $\log_2$ -Titer ~ Faktor  
16.

| Empfängervorbehandlung                  | $\log_2$ -Titer |
|-----------------------------------------|-----------------|
| keine                                   | $15.8 \pm 1.4$  |
| $1/2 \text{ LD}_{50}^1$ Cyclophosphamid | $17.6 \pm 1.6$  |
| $1/2 \text{ LD}_{50}^1$ Röntgen         | $18.6 \pm 1.4$  |
| $1 \text{ LD}_{50}^1$ Cyclophosphamid   | $21.4 \pm 1.5$  |
| $1 \text{ LD}_{50}^1$ Röntgen           | $20.2 \pm 2.0$  |

Keine signifikanten Unterschiede  
zwischen Cyclophosphamid- und Rönt-  
gengruppen!

Tab. 2: Der Einfluß einer radiologischen bzw. zytostatischen Empfängervorbehandlung auf die Effizienz eines Transplantats immunologisch determinierter Stammzellen (Inokulum = Y-Zellen + Zweitdosis Testantigen). Maßstab ist die vom Inokulum gelieferte immunologische Sekundärreaktion (arithmetisches Mittel der 8 - Tage-Titer; Vertrauensbereich bei  $2 P = 0.05$ ). Bezugswert die nicht vorbehandelte Kontrollgruppe. Ab  $1/2 \text{ LD}_{50}^1$  führten Strahlen wie Zytostatikum (Cyclophosphamid) zu einer signifikanten Leistungszunahme ( $2 P < 0.05$ ), die zudem auf äquitoxischer Basis gleich war ( $2 P < 0.05$ ).

| in vivo-Kultur              | intravenös                                                                   | intraperitoneal in Diffusionskammern                                         |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Inokulum                    | $2.5 \times 10^7$ sensib.Milzzellen<br>$2.5 \times 10^8$ Schafererythrozyten | $1.2 \times 10^7$ sensib.Milzzellen<br>$1.2 \times 10^6$ Schafererythrozyten |
| Empfängervor-<br>behandlung |                                                                              |                                                                              |
| 0 r                         | $16.9 \pm 0.5$                                                               | $10.4 \pm 0.8$                                                               |
| 750 r                       | $21.6 \pm 1.0$                                                               | $14.6 \pm 1.2$                                                               |

Signifikante Unterschiede zwischen 0 r- und 750 r-Gruppe!

Tab. 3: Grundlagen der durch die radiologische Empfängervorbehandlung bewirkten Leistungssteigerung eines Transplantats immunologisch determinierter Stammzellen (Inokulum = Y-Zellen + Zweitdosis Testantigen). Aufgetragen ist die vom Inokulum gelieferte immunologische Sekundärreaktion (arithmetisches Mittel der 8 - Tage-Titer; Vertrauensbereich bei  $2 P = 0.05$ ) mit der 0 r-Gruppe als Bezugswert. Bei einer 750 r-Vorbehandlung kam es zu einer signifikanten Leistungszunahme unabhängig davon, ob das Inokulum direkt intravenös oder, in Diffusionskammern eingeschlossen, intraperitoneal übertragen worden war. Da die Diffusionskammer hinsichtlich "space factor" und Mikromilieu konstante Bedingungen garantierte, ließ sich der im Kammeransatz zwischen 0 und 750 r beobachtete Leistungszuwachs ausschließlich humoralen Faktoren zuschreiben.

| Vorbehandlung<br>Primärwirt | Verweildauer der Kammer<br>im Primärwirt (Std.) | log <sub>2</sub> -Titer im nichtvor-<br>behandelten Sekundärwirt |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 750 r                       | 0                                               | 10.4 $\pm$ 0.8                                                   |
|                             | 12                                              | 13.3 $\pm$ 0.8                                                   |
|                             | 24                                              | 13.0 $\pm$ 1.5                                                   |
|                             | 48                                              | 13.0 $\pm$ 1.8                                                   |
|                             | 72                                              | 13.6 $\pm$ 1.4                                                   |

Signifikante Unterschiede zwischen 0-Std.- und 12-72-Std.-  
Gruppen!

Tab. 4: Verweildauer im radiologisch vorbehandelten Empfänger und Leistungssteigerung eines Transplantats immunologisch determinierter Stammzellen (Inokulum = Y-Zellen + Zweitdosis Testantigen). Doppeltransfer des Inokulums in Diffusionskammern über den vorbehandelten Primärwirt (Verweildauer variabel) auf nichtvorbehandelte Sekundärwirte. Maßstab der abhängig von der Verweildauer im Primärwirt bewirkten Effizienzsteigerung ist die vom Inokulum im Zweitwirt gelieferte immunologische Sekundärreaktion (arithmetisches Mittel der 8 - Tage - Titer; Vertrauensbereich bei 2 P = 0.05), Bezugswert die 0-Std.-Gruppe. Schon 12 Std. Aufenthalt im bestrahlten Primärwirt hatten eine signifikante Leistungssteigerung zur Folge (2 P < 0.05), die insofern optimal war, als sie auch bei längerer Verweildauer nicht weiter verbessert werden konnte (2 P < 0.05).

| Empfängervor-<br>behandlung | Transfer<br>von | Intervall<br>zwischen<br>Vorbehandlung<br>u. Transfer | $\log_2$ -Titer | Differenz<br>zu<br>0 r-Gruppe |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| 0 r                         | sensib.         | 0 Tage                                                | $15.5 \pm 0.6$  |                               |
| 750 r                       | Milz-           | 0 Tage                                                | $20.5 \pm 0.5$  | signi-                        |
|                             |                 | 1                                                     | $18.3 \pm 1.6$  | fikant                        |
|                             | zellen          | 2                                                     | $18.6 \pm 0.6$  | "                             |
|                             |                 | 4                                                     | $18.0 \pm 0.5$  | "                             |
|                             | +<br>Test-      | 7                                                     | $17.2 \pm 0.4$  | "                             |
|                             |                 | 9                                                     | $16.3 \pm 0.8$  | nicht "                       |
|                             | antigen         | 11                                                    | $17.1 \pm 0.6$  | "                             |
|                             |                 | 14                                                    | $16.2 \pm 0.7$  | nicht "                       |

Tab. 5: Kinetik des durch die radiologische Empfänger-  
vorbereitung freigesetzten, die  
Effizienz eines Transplantats immunologisch  
determinierter Stammzellen steigernden Faktors  
(Inokulum = Y-Zellen + Zweitdosis Testantigen).  
Übertragung des Inokulums auf den Empfänger  
zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Em-  
pfeingervorbestrahlung. Bestimmung der relativen  
Stärke des stimulierenden Faktors an Hand der  
vom Inokulum gelieferten immunologischen Se-  
kundäraktion (arithmetisches Mittel der  
8 - Tage - Titer; Vertrauensbereich bei  
2 P = 0.05), Bezugswert die 0 r - Gruppe.  
Nach raschem initialen Abfall ( $t_{1/2}$  = 0.5 Tage)  
protrahierter Abfall während ca. 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Woche  
( $t_{1/2}$  = 4.0 Tage). Globale  $t_{1/2}$  = 2.5 Tage. Am  
9. Tag nach Empfänger-  
vorbereitung war ein  
stimulierender Effekt nicht mehr nachweisbar  
(2 P < 0.05).

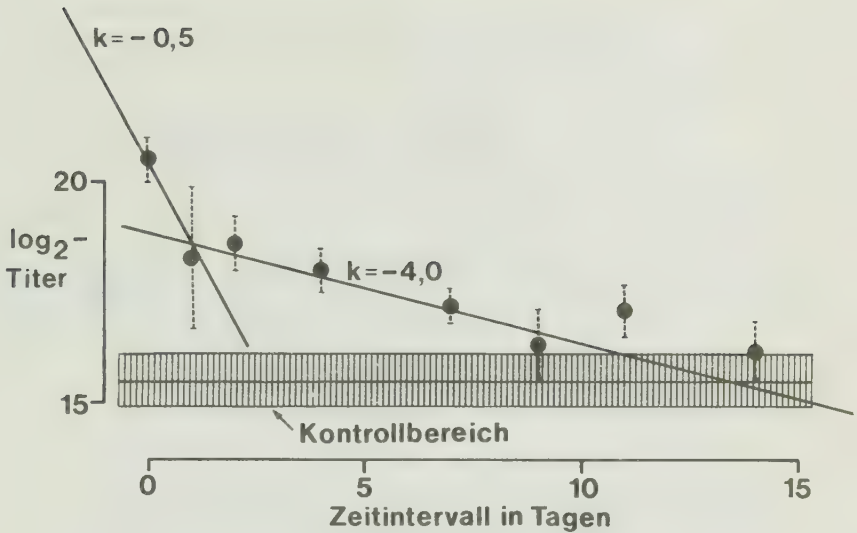


Abb. 2: Grafische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 5. Ordinate: Ausdruck der relativen Stärke des durch die 750 r-Vorbehandlung freigesetzten stimulierenden Faktors sind die vom Inokulum (Y-Zellen + Zweitdosis Testantigen) gelieferten 8 - Tage - Titer (arithmetisches Mittel; Vertrauensbereich bei  $2 P = 0.05$ ), bezogen auf das Ergebnis der 0 r - Kontrolle (schraffiert). Die Abszisse zeigt das Zeitintervall zwischen Empfänger-vorbestrahlung und Transfer des Inokulums.  $k$  = Steigung der nach Augenmaß gelegten Regressionsgeraden.

| Empfänger-<br>vorbehand-<br>lung | Inokulum<br>zum<br>Zeitpunkt<br>0 | Testantigengabe zum Zeitpunkt |                |                |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|
|                                  |                                   | + 1 Wo.                       | + 2 Wo.        | + 4 Wo.        |
| 750 r                            | sensib.<br>Milz-<br>zellen        | 15.1 $\pm$ 0.8                | 14.3 $\pm$ 0.4 | 14.9 $\pm$ 0.5 |
| 0 r                              | sensib.<br>Milz-<br>zellen        | 8.8 $\pm$ 1.2                 | 9.0 $\pm$ 0.7  | 9.3 $\pm$ 1.2  |
| 0 r                              | Ø                                 | 9.0 $\pm$ 1.0                 | 8.8 $\pm$ 0.6  | 9.6 $\pm$ 0.6  |
| 750 r                            | Ø                                 | 0.0                           | 1.0 $\pm$ 1.0  | 0.8 $\pm$ 0.8  |

Tab. 6: Persistenz der durch die Empfängervorbestrahlung bewirkten Stimulation eines (Stamm-)Zelltransplantats. Transfer von immunologisch determinierten Stammzellen auf nichtvorbestrahlte (0 r) bzw. optimal vorbehandelte (750 r) isologe Wirte und Abruf ihrer Sekundärantwort durch Zweitdosis Testantigen 1, 2 bzw. 4 Wo. später. Die durch die Stimulation auf (Stamm-)Zellebene bewirkte Zustandsänderung drückte sich aus in der Differenz der 8 Tage nach Antigengabe ermittelten Antikörpertiter 750 r - vs. 0 r - Gruppe (Zeile 1 - 2) (arithmetische Mittel; Vertrauensbereich bei 2 P = 0.05). Auf dem Hintergrund entsprechend angelegter Kontrollen (immunologische Primärantwort nichtbestrahlter Wirte, Zeile 3; Langzeitimmunsuppression durch 750 r, Zeile 4) wiesen die Transfergruppen klar aus, daß die strahleninduzierte Stimulation auf (Stamm-)Zellebene eine langanhaltende positive Zustandsänderung zur Folge hat.

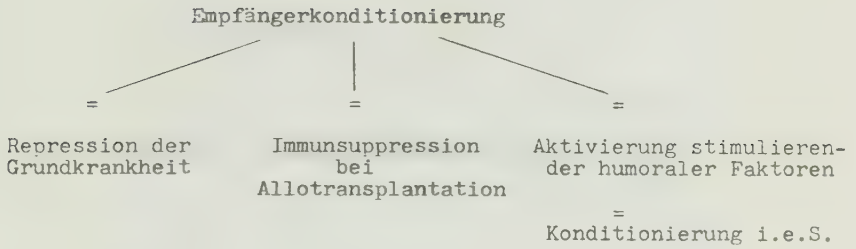


Abb. 3: Empfängerkonditionierung = Summe verschiedener definierter bzw. noch zu präzisierender Einzeleffekte.

## 8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ACS/NIH  
Organ transplant registry: third scientific report.  
J. amer. med. Ass. 266: 1211-1216 (1973)
2. ALBERT, E.D.  
Die Histokompatibilitätssysteme des Menschen und ihre Bedeutung für die immunologische Spenderauswahl.  
Transf. & Immunhaemat. 2: 811-818 (1974)
3. BOYUM, A.W. BOECKER, A.L. CARSTEN, E.P. CRONKITE  
Proliferation of human bone marrow cells in diffusion chambers implanted into normal or irradiated mice.  
Blood 40: 163-173 (1972)
4. BOYUM, A., A. CARSTEN, O.D. LAERUM, E.P. CRONKITE  
Kinetics of cell proliferation of murine bone marrow cells cultured in diffusion chambers. Effect of hypoxia, bleeding, erythropoietin injections, polycythemia and irradiation of the host.  
Blood 40: 174-188 (1972)
5. CAPALBO, E.E., J.F. ALBRIGHT, W.E. BENNETT  
Evaluation of the diffusion chamber culture technic for study of the morphological and functional characteristics of lymphoid cells during antibody production.  
J. Immunol. 92: 243-251 (1964)
6. CELADA, F.  
Quantitative studies on the adoptive immunological memory in mice. I. An age-dependent barrier to syngeneic transplantation.  
J. Exp. Med. 124: 1-14 (1966)

7. CONGDON, C.C.  
Bone marrow transplantation.  
Science 171: 1116-1124 (1971)
8. Documenta GEIGY,  
Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage  
(J.R. Geigy AG, Basel 1968)
9. DUPONT, B., L. STAUB-NIELSEN, A. SYEJGAARD  
Relative importance of Four and LA loci in  
determining mixed-lymphocyte reaction.  
Lancet 2: 1336-1340 (1971)
10. ESSERS, U., S. JOOST, E. BRUNNER  
Hinweise auf die Existenz eines die Pro-  
liferation pluripotenter Stammzellen för-  
dernden Plasmafaktors.  
Vortrag: Kongreß Dtsch. Ges. f. inn. Med.  
Wiesbaden, 1974.
11. FASS, L., H. D. OCHS, E. D. THOMAS, E. MICKELSON,  
R. STORB, A. FEFER  
Studies of immunological reactivity  
following syngeneic or allogeneic marrow  
grafts in man.  
Transplantation 16: 630-640 (1973)
12. FLIEDNER, T. M.  
Lymphozyt = Lymphozyt?  
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79: 129-137 (1973)
13. FLOERSHEIM, G. L., R. STORB  
Knochenmarktransplantation bei aplastischen  
Anämien und akuten Leukämien. Einsichten und  
Aussichten.  
Schweiz. med. Wschr. 104: 3-10, 52-29, 87-94  
(1974)

14. FRIED, W., W. CHAMBERLIN, A. KEDD, J. BARONE  
Effect of x-irradiation and Cy on  
stromal factors and on hematopoiesis.  
Exp. Hemat. 1: 259-260 (1973)
15. GALE, R.P., G. OPELZ, R. SPARKES and the ULCA  
BONE MARROW TRANSPLANTATION GROUP  
Bone marrow transplantation between  
lymphocyte culture-reactive individuals.  
Transplantation 20: 194-197 (1975)
16. GALLAGHER, M.T., J.M. RAUCHWERGER, H.J. MONIE<sup>^</sup>,  
J.J. TRENTIN  
Hybrid resistance, CFU repression, poor  
growth phenomenon, and xenogeneic resistance:  
Manifestations of a common mechanism of  
"genetic resistance" to marrow transplan-  
tation.  
Exp. Hemat. 1: 285 (1973)
17. GLUCKSBERG, H., R. STORB, A. FEFER, C.D. BUCKNER,  
P.E. NEIMAN, R.A. CLIFT, K.G. LERNER, E.D. THOMAS  
Clinical manifestations of graft-versus-host  
disease in human recipients of marrow from  
HL-A-matched sibling donors.  
Transplantation 18: 295-304 (1974)
18. GOODMAN, S.A., M.G. CHEN, T. MAKINODAN  
An improved primary response from mouse  
spleen cells cultured in vivo in diffusion  
chambers.  
J. Immunol. 108: 1387-1399 (1972)
19. HALASA, J.  
Role of x, y and z cells in secondary immuno-  
logical response.  
Nature, Lond. 217: 859-860 (1969)

20. HOPPE, I.  
Unveröffentliche Ergebnisse.
21. KILLMAN, S.-A., E.P. CRONKITE, T.H. FLIEDNER,  
V.P. BOND, G. BRECHER  
Mitotic indices of human bone marrow cells.  
II. The use of mitotic indices for estimation  
of time parameters of proliferation in  
serially connected multiplicative cellular  
compartments.  
Blood 21: 141-163 (1963)
22. KNOSPE, W.H., S.A. GREGORY, W. FRIED, F.E.  
TROBAUGH, jr.  
Stimulation of hematopoiesis by femoral  
marrow curettage in sublethally irradiated  
mice.  
Blood 41: 519-527 (1973)
23. LAISSUE, J.A., A.D. CHANANA, E.P. CRONKITE,  
D.D. JOEL, M. PAVELEC  
Culture of autologous bone marrow in  
diffusion chambers: Effect of host irradiation.  
Blood 45: 417-425 (1975)
24. LOZZIO, B.B.  
Regulators of cell division. A review: I.  
Endogenous mitotic inhibitors of hematopoietic  
cells.  
Exp. Hemat. 1: 309-339 (1973).
25. MAKINODAN, T., J.F. ALBRIGHT.  
Proliferative and differentiative mani-  
festations of cellular immune potential.  
Progr. Allergy 10: 1-36 (1967)

26. MAKINODAN, T., N. GENGQZIAN, C. C. CONGDON  
Agglutinin production in normal sub-  
lethally irradiated mice treated with  
mouse bone marrow.  
J. Immunol. 77: 250-256 (1956)
  
27. MAKINODAN, T., P. CAPALBO, E. CELADA, E. H.  
PERKINS, J. F. ALBRIGHT  
Studies on immune reactions in in-vivo  
cultures.  
Proc. Int. Symp. on Tissue Transpl.:  
73-86 (Universidad de Chile, Santiago 1962)
  
28. Mc CULLOCH, E. A., J. E. TILL  
The sensitivity of cells from normal  
mouse bone marrow to gamma radiation in-vitro  
and in-vivo.  
Radiat. Res. 16: 822-832 (1962)
  
29. METCALF, D.  
Regulation of granulocyte and monocyte  
macrophage proliferation by colony stimulating  
factor (CSF). A review.  
Exp. Hemat. 1: 185-201 (1973)
  
30. PERKINS, E. H., T. MAKINODAN  
Relative poolsize of potentially competent  
antibody-forming cells of primed and  
nonprimed spleen cells grown in in-vivo  
culture.  
J. Immunol. 92: 192-200 (1964)
  
31. PERKINS, E. H., M. A. ROBINSON, T. MAKINODAN  
Agglutinin response, a function of cell  
number.  
J. Immunol. 86: 533-537 (1961)

32. PETT, F.M.  
Effekt einer in vitro-Lagerung auf die Vitalität organisierter Stammzellen.  
(Determinierte Stammzellen vom Typ Y/PC<sub>2</sub>/AFC<sub>2</sub>)  
Inaug. Diss. Berlin, 1975
33. van ROOD, J.J., V.P. EIJSVOGEL  
HL-A identical phenotypes and genotypes in unrelated individuals.  
Lancet 1: 698-700 (1970)
34. van ROOD, J.J., A. van LEEUWEN, J.J. KEUNING, A. BLUSSE van OUD ABLAS  
The serological recognition of the human MLC determinants using a modified cytotoxicity technic.  
Tissue Antigens 5: 73-79 (1975)
35. van ROOD, J.J., C.T. KOCH, J.P. van HOOFF, A. van LEEUWEN, J.G. van den TWEEL, E. FREDERIKS, H.M.A. SCHIPPERS, G. HENDRIKS, G.J. van der STEEN  
Graft survival in unrelated donor-recipient pairs matched for MLC and HL-A.  
Transplant. Proc. 5: 409-414 (1973)
36. ROBINS, M.M., W.D. NOYES  
Aplastic anemia treated with bone-marrow transfusion from an identical twin  
New Engl. J. Med. 265: 974-979 (1961)
37. SADO, T., T. MAKINODAN  
The cell cycle of blast cells involved in secondary antibody response.  
J. Immunol. 93: 696-700 (1964)

38. SANTOS, G.W., P.J. TUTSCHKA  
Effect of Busulfan (BU) and rabbit anti-rat lymphocyte serum (RARLS) on the quality of marrow engraftment in the cyclophosphamide (CY) treated rats.  
Exp. Hemat. 1: 69-70 (1973)
39. SANTOS, G.W., L.L. SENSENBRENNER, P.J. BURKE, M. COLVIN, A.H. OWENS, jr. W.B. BIAS, R.E. SLAVIN  
Marrow transplantation in man following cyclophosphamide.  
Transplant. Proc. 3: 400-404 (1971)
40. SETO, F.  
Enhanced antibody production by grafted peripheral blood immunocytes in cyclophosphamide-treated allogeneic chick embryo hosts.  
Exp. Hemat. 2: 219-226 (1974)
41. SØRENSEN, F.S., L. STAUB-NIELSEN  
The genetic basis for reactivity in human mixed lymphocyte culture. II. Studies of unrelated subjects identical at the HL-A subloci "LA" and "Four".  
Acta path. microbiol. scand. 78: 719-725 (1970)
42. SPECK, B.  
Bone marrow transplantation - clinical results and problems.  
Blut 27: 297-301 (1973)
43. SPECK, B.  
Indikationen zur Knochenmarktransplantation bei Patienten mit aplastischer Anämie und akuter Leukämie.  
Schweiz. med. Wschr. 103: 508-511 (1973)

44. SPECK, B.  
Möglichkeiten und Probleme der  
klinischen Knochenmarktransplantation.  
Med. Welt. 26: 39-43 (1975)
45. SPECK, B., M. KISSLING  
Studies on bone marrow transplantation in  
experimental <sup>32</sup>P-induced aplastic anemia  
after conditioning with antilymphocytic  
serum.  
Acta haem., Basel 50: 193-199 (1973)
46. STENRAM, U.  
Transplantation xenogener Zellen nach  
Vorbehandlung der Empfängerermäuse mit  
Endoxan im subletalen Bereich.  
Inaug. Diss. München, 1971
47. STERZL, J.  
Studies of differentiation of immuno-  
competent cells using immunological  
inhibition.  
Antibiot. Chemother., N.Y. 15: 135-154 (1969)
48. STORB, R., C. D. BUCKNER, A. FEFER, R. A. CLIFT,  
P. E. NEIMAN, H. GLUCKSBERG, K. G. LERNER, E. D. THOMAS  
Marrow transplantation in aplastic anemia.  
Transplant. Proc. 6: 355-358 (1974)
49. STORB, R., E. GLUCKMAN, E. D. THOMAS, C. D. BUCKNER,  
R. A. CLIFT, A. FEFER, H. GLUCKSBERG, T. C. GRAHAM,  
F. L. JOHNSON, K. G. LERNER, P. E. NEIMAN, H. OCHS  
Treatment of established human graft-versus-host  
disease by antithymocytic globulin.  
Blood 44: 57-75 (1974)

50. TAKADA, Y., A. TAKADA  
Proliferation of donor hematopoietic cells  
in irradiated and unirradiated host mice.  
Transplantation 12: 334-338 (1971)
51. TAVASSOLI, M.  
Studies on hemopoietic microenvironments.  
Exp. Hemat. 3: 213-226 (1975)
52. TRENTIN, J. J., J. M. RAUCHWERGER, M. T. GALLAGHER  
Genetic resistance to marrow transplantation.  
Biomedicine 18: 86 (1973)
53. TYLER, W. S., E. NISKANEN, F. STOHLMAN, jr.  
J. KEANE, D. HOWARD  
The effect of neutropenia on myeloid growth  
and the stem cells in an in vivo culture  
system.  
Blood 40: 634-645 (1972)
54. WEILER, E.  
Delayed antibody synthesis in mice after  
transfer of immune peritoneal fluid cells.  
Immunology, Lond. 7: 197-212 (1964)
55. WAGNER, H. P., H. COTTIER, E. P. CRONKITE, L. CUNNINGHAM,  
C. R. JANSEN, K. R. RAI  
Studies on lymphocytes. V. Short in vivo  
DNA-synthesis and generation time of lymphoid  
cells in the calf thoracic duct after simulated  
or effective extracorporeal irradiation of  
circulating blood.  
Exp. Cell Res. 46: 441-451 (1967)
56. WEILER, E.  
Delayed antibody synthesis in mice after  
transfer of immune peritoneal fluid cells.  
Immunology, Lond. 7: 197-212 (1964)

## L E B E N S L A U F

Am 20.1.1944 wurde ich als Sohn des Kaufmannes  
Tjay Lok O e y und seiner Ehefrau Bok Nio,  
geb. O n g, in Sukabumi - Indonesien geboren.

|                  |                                                                                                                            |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1950 - 1956      | Besuch der christlichen<br>Grundschule in Djakarta -<br>Indonesien                                                         |
| 1956 - 1959      | Besuch der Mittelstufe der<br>christlichen Schule in<br>Djakarta - Indonesien                                              |
| 1959 - 1962      | Besuch der Oberstufe der<br>christlichen Schule in<br>Djakarta - Indonesien, wo<br>ich am                                  |
| 13.7.1962        | das Abitur ablegte.                                                                                                        |
| 1963 - 1966      | Studium der Medizin an der<br>privaten christlichen<br>Universität "Maranatha" in<br>Bandung - Indonesien.                 |
| Mai 1966         | kam ich in die Bundesrepublik<br>Deutschland.                                                                              |
| November 1966    | Immatrikulation an der<br>Freien Universität Berlin<br>im Studienkolleg für aus-<br>ländische Studierende                  |
| 9.10.1967        | Erwerb des Zeugnisses zur<br>Feststellung der Hochschul-<br>reife für die Hochschulen in<br>der Bundesrepublik Deutschland |
| 15.4.1968        | Beginn des Medizinstudiums an<br>der Freien Universität Berlin                                                             |
| 10.3.1969        | Naturwissenschaftliche Vor-<br>prüfung (Vorphysikum)                                                                       |
| 18.9.1970        | Ärztliche Vorprüfung (Physikum)                                                                                            |
| 1.3.1974         | Ärztliche Prüfung (Staatsexamen)                                                                                           |
| 1.6.74 - 30.9.74 | Medizinalassistent auf der II.<br>inneren Abteilung des Städt.<br>Krankenhauses Spandau-Nord in<br>Berlin                  |

- 1.1.75 - 30.4.75      Medizinalassistent auf der  
geburtshilflich - gynäkolo-  
gischen Abteilung des Städt.  
Krankenhauses Spandau-Nord in  
Berlin
- 1.5.75 - 31.8.75      Medizinalassistent auf der  
chirurgischen Abteilung des  
Marienhospitals in Oelde -  
Westfalen.

Seit dem 1.9.75 bin ich als Assistentsarzt auf der  
geburtshilflich - gynäkologischen Abteilung des  
Marienhospitals in Oelde - Westfalen tätig.







